



Automação de Planilhas Eletrônicas para o Cálculo de Índices de Retenção na Análise de Óleos Essenciais

Paola Ervatti Gama¹
Eduardo Gazaneo Barboza²
Marcelly Cristina da Silva Santos³
Humberto Ribeiro Bizzo⁴

Introdução

Um óleo essencial (OE) é definido como o produto obtido de matérias-primas naturais de origem vegetal, por destilação a vapor, ou destilação a seco, após a separação da fase aquosa por processos físicos. No caso específico de frutos cítricos, o óleo é obtido por meio de prensagem do epicarpo do fruto, em temperatura ambiente, conforme definido na International Organization for Standardization (2013) no item *cold pressed essential oil*.

Por serem misturas complexas, os componentes presentes nos óleos essenciais, muitas vezes, algumas centenas, necessitam ser separados, antes ou durante o processo analítico, para depois serem quantificados e identificados. A cromatografia em fase gasosa é a técnica de separação mais usada para a análise de óleos essenciais. Dentre as suas vantagens está a possibilidade de se acoplar ao cromatógrafo um espectrômetro de massas para funcionar como detector. Assim, espectros de massas dos componentes previamente separados podem ser obtidos e comparados com espectros de bases de dados.

Entretanto, a obtenção somente do espectro de massas e sua comparação com a base de dados não é suficiente, na maioria dos casos, para a identificação

correta dos componentes dos óleos essenciais. Isto acontece porque muitos componentes são isôbaros, isto é, possuem a mesma massa e, além disso, são isômeros entre si. Isso faz com que os espectros de massas de duas substâncias diferentes possam ser praticamente idênticos, impedindo uma identificação inequívoca. Por esta característica, uma segunda técnica de identificação precisa ser utilizada.

A injeção de padrões autênticos pode ser usada para a confirmação da identificação de um dado componente. Entretanto, não há padrões comerciais disponíveis para um elevado número de componentes de óleos essenciais, particularmente os sesquiterpenos e seus derivados oxigenados.

Para contornar este problema podem ser usados os índices de retenção, que são calculados pela normalização dos tempos de retenção dos constituintes dos óleos essenciais em relação a uma série homóloga. Os índices de retenção foram desenvolvidos pelo professor Ervin Kováts (KOVÁTS, 1958), que utilizou uma série homóloga de n-alcenos. A normalização de Kováts, ou os índices de Kováts (IK ou apenas I), são calculados em uma escala logarítmica (equação 1). Uma limitação do método é que a temperatura do processo de separação, ou seja, da cromatografia, deve ser constante.

¹ Química, D.Sc. em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

² Graduando em Engenharia Química, bolsista CNPq-Brasil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

³ Farmacêutica, M.Sc. em Ciência de Alimentos, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

⁴ Químico Industrial, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

$$I_T^A = \frac{\log(t_r X) - \log(t_r N)}{\log(t_r N_{+1}) - \log(t_r N)} + 100.n \quad (1)$$

Onde:

I : índice de Kováts na temperatura T e fase estacionária A

$t_r X$: tempo de retenção do componente X

$t_r N$: tempo de retenção do alcano N com t_r anterior ao componente X

$t_r N_{+1}$: tempo de retenção do alcano N com t_r posterior ao componente X

n : número de átomos de carbono do alcano N

A programação de temperatura do processo cromatográfico é uma variável importante no ajuste da separação dos componentes dos óleos essenciais. Uma aproximação da equação de Kováts, para ser usada em condições de temperatura variável, foi desenvolvida por Van den Dool e Kratz (1963). Neste caso, trata-se de uma equação linear, e o resultado é chamado de índice de retenção linear IRL (algumas vezes, IR), que é calculado conforme a equação 2, a seguir:

$$IRL = \frac{t_r X - t_r N}{t_r N_{+1} - t_r N} + 100.n \quad (2)$$

Onde:

IRL: índice de retenção linear

$t_r X$: tempo de retenção do componente X

$t_r N$: tempo de retenção do alcano N com t_r anterior ao componente X

$t_r N_{+1}$: tempo de retenção do alcano N com t_r posterior ao componente X

n : número de átomos de carbono do alcano N

Outras séries homólogas, que não a de n -alcenos, também podem ser usadas. Encontram-se na literatura séries homólogas de ésteres de ácidos graxos: dodecanoato de metila, tetradecanoato de metila, hexadecanoato de metila, octadecanoato de metila etc. A série de n -alcenos, entretanto, permanece como a mais usada.

Na rotina diária do laboratório, utiliza-se uma planilha do Microsoft Office Excel® para a realização do cálculo com a equação 2 inserida, por exemplo, na sexta coluna da tabela da Figura 1.

Inicialmente, são digitados os valores dos tempos de retenção dos constituintes do óleo essencial em análise na segunda coluna, sempre em ordem crescente. Depois, nas colunas seguintes, digitam-se: a) o número de átomos de carbono do alcano que elui imediatamente antes do constituinte de interesse (C_n); b) o tempo de retenção dos alcanos que eluem antes ($t_r C_n$); c) o tempo de retenção do alcano que elui depois do pico em análise ($t_r C_{n+1}$). Na sexta coluna obtém-se o índice de retenção linear (IRL) para o componente. As colunas seguintes contêm os tempos de retenção dos componentes da série homóloga (alcenos), que são injetados na mesma coluna e nas mesmas condições analíticas, e o número de átomos de carbono de cada padrão.

Essa alimentação de dados na planilha era feita manualmente, linha por linha, sendo a fase crítica a

comparação de cada tempo de retenção dos componentes da amostra, pico a pico, com seu respectivo intervalo de dados da série homóloga.

O processo de análise de dados e avaliação de resultados de IRL depende da inserção correta de todos os dados, em planilhas com extenso número de linhas, em geral mais de 50. Ou seja, o cálculo do valor de IRL é dependente do preenchimento manual e correto das informações obtidas na injeção, com especial atenção às colunas C_n , $t_r C_n$ e $t_r C_{n+1}$, da série homóloga de hidrocarbonetos. No caso de serem analisadas centenas de amostras anualmente, a atividade de preenchimento das tabelas se torna repetitiva, consome muito tempo e estressa a atenção do analista. Qualquer número errado implica retrabalho e aumento do tempo necessário à conclusão da análise, podendo, mesmo, conduzir a uma identificação errônea de alguns constituintes.

Assim, foi elaborada uma planilha onde o processo de preenchimento foi automatizado, tendo sido empregadas as funções PROCV, ÍNDICE e CORRESP existentes na plataforma do Microsoft Office Excel®.

O comando PROCV é utilizado para localizar uma informação correspondente a um dado inserido, em uma tabela selecionada. Na tabela de cálculo do IRL, essa função é utilizada na determinação de $t_r C_n$ e C_n . Para o primeiro, o valor de pesquisa é o tempo de retenção (t_r) do pico em questão, a tabela é a coluna dos tempos de retenção da série homóloga ($t_r C_n$), e portanto, a coluna com o valor de retorno é a primeira ("1"). A correspondência é aproximada (representada pelo número "1"). A fórmula de cálculo desenvolvida (3) foi:

$$=PROCV(t_r; \text{matriz coluna de } t_r C_n; 1; 1) \quad (3)$$

Em relação ao segundo, o valor de pesquisa continua sendo o t_r do pico, porém a tabela agora contém as colunas de tempo de retenção da série homóloga e de número de átomos de carbono correspondente, respectivamente, e a correspondência continua aproximada. A fórmula digitada (4) foi:

$$=PROCV(t_r \text{ pico}; \text{matriz } t_r C_n [1^a \text{ coluna}] \text{ e } C_n [2^a \text{ coluna}]; 2; 1) \quad (4)$$

É importante enfatizar que a tabela auxiliar deve apresentar, necessariamente, os tempos de retenção na primeira coluna e o número de átomos de carbono na segunda coluna, ambos em ordem crescente.

A função ÍNDICE indica a informação contida numa célula de coordenadas de número de linha e coluna inseridas, dentro da tabela selecionada. O número da linha é dado pelo resultado da função CORRESP acrescido de uma unidade, ou seja, indica o valor $t_r C_{n+1}$. Este comando localiza a linha que corresponde a um dado inserido, em uma tabela contendo os valores a serem pesquisados. Assim, a equação elaborada (5) foi:

$$=ÍNDICE(\text{matriz } T_r \text{ KOVATS}; \text{CORRESP}(T_r \text{ pico}; \text{matriz } T_r \text{ KOVATS}; 1)+1; 1) \quad (5)$$

<div><div>=PROCV(B2;\$I\$2:\$I\$18;1;1)</div><div>=ÍNDICE(\$I\$2:\$I\$18;CORRESP(B2;\$I\$2:\$I\$18;1)+1;1)</div><div>=PROCV(B2;\$I\$2:\$J\$18;2;1)</div><div>=(B2-D2)/(E2-D2)+C2*100</div></div>										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Pico	t _r	C _n	t _r C _n	t _r C _{n+1}	IRL			t _r C _n	C _n
2	1	4,749	9	3,992	6,394	932			2,576	8
3	2	5,793	9	3,992	6,394	975			3,992	9
4	3	6,543	10	6,394	9,798	1004			6,394	10
5	4	7,157	10	6,394	9,798	1022			9,798	11
6	5	7,920	10	6,394	9,798	1045			13,878	12
7	6	20,912	13	18,229	22,575	1362			18,229	13
8	7	21,307	13	18,229	22,575	1371			22,575	14
9	8	22,032	13	18,229	22,575	1388			26,797	15
10	9	23,177	14	22,575	26,797	1414			30,852	16
11	10	23,566	14	22,575	26,797	1423			34,726	17
12	11	23,963	14	22,575	26,797	1433			38,358	18
13	12	26,408	14	22,575	26,797	1491			41,883	19
14	13	26,639	14	22,575	26,797	1496			45,251	20
15	14	26,877	15	26,797	30,852	1502			48,478	21
16	15	30,260	15	26,797	30,852	1585			51,572	22
17	16	30,952	16	30,852	34,726	1603			54,544	23
18	17	31,555	16	30,852	34,726	1618			57,395	24

t_r: tempo de retenção dos componentes do OE; C_n: número de átomos de carbono do alceno anterior; t_r C: tempo de retenção do alceno com t_r anterior ao componente; t_r C_{n+1}: tempo de retenção do alceno com t_r posterior ao componente.

Figura 1. Exemplo de planilha para o cálculo dos índices de retenção, com as fórmulas de cálculo em destaque.

A nova planilha precisa ser alimentada apenas com os tempos de retenção dos componentes do óleo essencial em análise e os tempos de retenção dos alcanos usados na série homóloga. Na prática diária, entretanto, os tempos de retenção de uma série homóloga são usados para o cálculo dos índices de retenção de várias amostras diferentes, quando injetadas em um mesmo lote, reduzindo ainda mais o tempo gasto para a alimentação da planilha.

O uso da planilha automatizada reduz o tempo e a quantidade de erros na digitação, o que evita o retrabalho e a possibilidade de erro na identificação dos constituintes, trazendo um aumento na eficiência e na qualidade dos resultados gerados pelo laboratório.

Referências

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9235**:2013: aromatic natural raw materials: vocabulary. Genebra, 2013. v, 9 p.

KOVÁTS, E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. **Helvetica Chimica Acta**, v. 41, n. 7, p. 1915-1932, 1958. DOI: 10.1002/hlca.19580410703.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963. DOI: 10.1016/S0021-9673(01) 80947-X.

Comunicado Técnico, 226

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (21) 3622-9600 / **Fax:** (21) 3622-9713
Home Page: www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição
1ª impressão (2017): tiragem (50 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: Ana Iraidy Santa Brígida, André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Leda Maria Fortes Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Renata Torrezan e Rogério Germani

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De Grandi C. F. de Sá
Revisão de texto: Janine Passos Lima da Silva
Normalização bibliográfica: Celma R. M. de Araujo
Editoração eletrônica: André Luis do N. Gomes